

Udział metabolitów pośrednich w metabolizmie estrogenów w uszkodzeniach oksydacyjnych DNA kobiet w ciąży analizowany metodą ścieżek

Małgorzata Kalembe-Drożdż¹, Stanisław Matusik²,
Tomasz Milewicz³, Maria Kapiszewska^{1*}

Streszczenie

W okresie ciąży stężenie hormonów płciowych, m.in. 17 β -estradiolu (E2), progesteronu, a także metabolitów pośrednich takich jak DHEA, czy cholesterol, będący substratem do ich syntezy. Ten wzrost w stężeniu hormonów powoduje, że rośnie także stężenie potencjalnie genotoksycznych metabolitów rozkładu E2, czyli katecholi estrogenowych, które, jeśli nie zostaną usunięte w reakcji sprzęgania, mogą prowadzić do uszkodzeń oksydacyjnych DNA. Powodem powstawania uszkodzeń są reaktywne formy tlenu (RFT) powstające w reakcjach między wolnorodnikowymi formami semichinonów i chinonów tych związków. Dzieje się tak jednak jedynie wtedy, gdy poziom RFT przekroczy zdolności antyoksydacyjne komórek. Taką ochronną rolę pełni także E2. Może to oznaczać, że powstające RFT, które są także cząsteczkami istotnymi dla sygnalizacji komórkowej podczas rozwoju płodu po spełnieniu swej roli są usuwane z komórek dzięki antyoksydacyjnym właściwościom E2. Pytanie zatem o rolę E2, a także innych produktów metabolizmu estrogenów, z punktu widzenia poziomu oksydacyjnych uszkodzeń DNA w komórkach, wydaje się pytaniem istotnym. Aby przybliżyć odpowiedź na to pytanie, sprawdzono poziom oksydacyjnych uszkodzeń zasad purynowych i pirymidynowych w DNA limfocytów kobiet w ciąży (N=65) metodą kometową, zaś udział cholesterolu, E2, progesteronu i DHEA w poziomie tych uszkodzeń analizowano wykorzystując analizę ścieżek. Pokazana hierarchia wpływów tych metabolitów na uszkodzenia oksydacyjne DNA potwierdziła ochronną rolę E2, podczas gdy pozostałe związki wykazują dodatni efekt. Model ten jednak wyjaśnia zaledwie kilka procent zmienności w poziomie uszkodzeń.

Słowa kluczowe: hormony płciowe, 17 β -estradiol, uszkodzenia oksydacyjne DNA, analiza ścieżek

* Rozdział został sfinansowany w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego Nr N N303 2403 33.

1 – Wydział Zdrowia i Nauk Medycznych, Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego;

2 – Zakład Statystyki i Informatyki, Akademia Wychowania Fizycznego w Krakowie;

3 – Klinika Endokrynologii Ginekologicznej, Collegium Medicum, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński.

Intermediate metabolites of estrogen metabolism in oxidative DNA damage in pregnant women studied by paths

Abstract

Oxidative stress in the human body is caused by excessive generation of reactive oxygen species (ROS), in response to metabolism fluctuations and/or environmental conditions. The level of ROS level in the body is controlled by antioxidative enzymes but also by ingredients of the diet. Excessive production of ROS, exceeding the antioxidant capacity of body can lead to DNA damage. However ROS are not only a destructive factor but they also play an important role in cell signaling and in hormonal status during prenatal life. During pregnancy, sex hormone levels undergo drastic change. That refers to 17 β -estradiol, progesterone, and the intermediate metabolites such as DHEA or cholesterol. The increase in concentration of sex hormones also enhances the level of catechol estrogens, which, if not removed by conjugation can cause oxidative DNA damage as a result of the formation of free radicals in redox-cycling reactions. However, 17 β -estradiol is also a naturally occurring antioxidant that during pregnancy may play a protective role. During the entire pregnancy the 17 β -estradiol, progesterone, DHEA and cholesterol concentrations were measured in pregnant women (N=65). Using the same blood samples the lymphocytes were isolated and the level of oxidative damage in DNA was evaluated using comet assay. The results, presented as a path analysis, disclosed the hierarchy of influence of these metabolites on the oxidative damage of purine and pyrimidine bases as well as a protective role of 17 β -estradiol in oxidative damage produced in cells during pregnancy.

Key words: sex hormones, 17 β -estradiol, oxidative DNA damage, path diagram

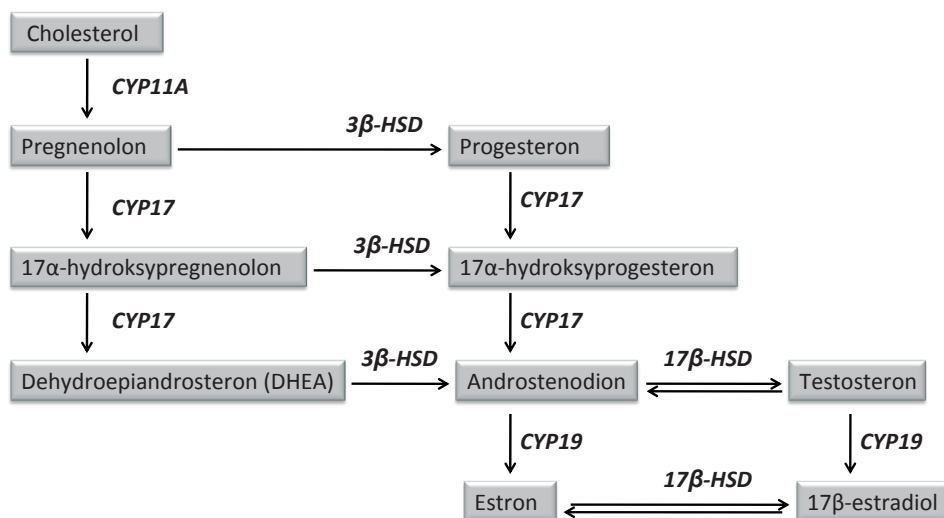
Wprowadzenie

Stres oksydacyjny jest efektem nadmiernej produkcji reaktywnych form tlenu (RFT) powstających podczas metabolizmu w normalnych warunkach fizjologicznych, bądź jako odpowiedź organizmu na warunki środowiskowe. To zaburzenie homeostazy jest zwykle postrzegane jako czynnik destrukcyjny mogący prowadzić do uszkodzenia komórek i tkanek. W szczególności nienaprawione lub błędnie naprawione uszkodzenia w DNA mogą być przyczyną transformacji nowotworowych. Równocześnie RFT są ważnymi cząsteczkami biorącymi udział w sygnalizacji komórkowej uruchamiając np.: transkrypcję genów lub produkcję cytokin. Procesem, w którym RFT odgrywają istotną rolę jest reprodukcyjny cykl życiowy u kobiet, zaczynając od dojrzewania komórek jajowych (oocytów), zapłodnienia, poprzez rozwój embrionu w całym okresie ciąży, do porodu włącznie. Stres oksydacyjny jest równocześnie czynnikiem szeregu klinicznie diagnozowanych zaburzeń takich jak: nadciśnienie podczas ciąży, rzucawka, niepłodność, powodzenie w zapłodnieniu *in vitro*, czy wzrost ryzyka poronienia. Zachowanie równowagi oksydacyjnej jest regulowane przez poziom enzymów antyoksydacyjnych, a także jest zależne od ilości spożywanych mikroelementów oraz witamin przeciwutleniających.

W artykule przedstawiono wyniki analiz udziału wybranych związków występujących w szlaku metabolicznym 17 β -estradiolu (E2), a także ich procentowy udział w uszkodzeniach DNA ocenianych w limfocytach kobiet w ciąży mającej prawidłowy przebieg. Starano się ustalić: czy i w jakim stopniu istnieje związek przyczynowo-skutkowy między stężeniami 17 β -estradiolu, progesteronu, DHEA, cholesterolu, a ilością uszkodzeń DNA. Analizy przeprowadzano metodą ścieżek, umożliwiającą ocenę wielkości oddziaływania bezpośredniego i pośredniego poszczególnych standaryzowanych zmiennych niezależnych (egzogenicznych), którymi są stężenia metabolitów pośrednich; ustalono także hierarchizację tych zmiennych pod względem wielkości wpływów na zmienną zależną, czyli poziom uszkodzeń alkalilabilnych oraz na poziom utlenionych zasad pirymidynowych i purynowych.

Zarys metabolizmu hormonów płciowych i ich znaczenie w ciąży

Hormonami steroidowymi, które odgrywają najważniejszą rolę w rozwoju płciowym kobiety są 17 β -estradiol (E2) i progesteron. Ich syntezę przedstawiono schematycznie na rycinie 1.



Ryc. 1. Schemat biosyntezy 17 β -estradiolu.

CYP11A1 – desmolaza cholesterolowa, 3 β -HSD – dehydrogenaza

3 β -hydroksysteroidowa, CYP17 – 17 α -hydroksylaza, CYP19 – aromataza,

17 β -HSD dehydrogenaza 17 β -hydroksysteroidowa

Podczas rozwoju ciąży produkcja zarówno E2, jak i progesteronu jest przejmowana przez łożysko. Od końca 3 miesiąca to głównie ten narząd płodowy jest odpowiedzialny za utrzymanie wysokiego stężenia hormonów we krwi matki i dziecka. Sądzi się, że estrogeny mają tak duże znaczenie w trakcie życia płodowego, ponieważ wpływają na podniesienie poziomu acetylacji histonów, a tym samym na rozluźnienie konformacji chromatyny, przez co zwiększa się dostępność DNA dla kompleksu transkrypcyjnego umożliwiając ekspresję genów niezbędnych w rozwoju płodu (Pasqualini, 2005). E2 łącząc się z receptorem estrogenowym kodowanym przez niezależne geny ER α i ER β zmienia jego konformację czyniąc go czynnikiem transkrypcyjnym. Tak uaktywnione receptory wiążą się do specyficznych sekwencji elementu odpowiedzi na estrogeny (ERE, ang. estrogen response element) obecnych w genach docelowych. Tym samym zmianie ulegają całe profile ekspresji genów w komórkach.

Stężenie hormonów płciowych u matki jest silnie skorelowane z ich stężeniem we krwi dziecka (Troisi, 2003). Po porodzie poziom zarówno 17 β -estradiolu, jak i progesteronu, gwałtownie spada do poziomu porównywalnego ze wczesną fazą folikularną. Poziom estrogenów w życiu płodowym może modulować podatność dziecka na zachorowanie na niektóre nowotwory w późniejszym wieku na przykład poprzez modyfikację zdolności komórek macierzystych do różnicowania (Baik, 2005). W około 98% estrogeny i progesteron występują w postaci związanej z białkami osocza: albuminą oraz globuliną wiążącą sterydy płciowe (SHBG – Sex Hormon Binding Globulin). Jedynie około 2% tych hormonów występuje w postaci wolnej w osoczu. Niezwiązane z białkami hormony sterydowe mają zdolność przenikania przez błonę komórkową i po związaniu z receptorem cytoplazmatycznym oddziałują na aparat genetyczny jądra komórkowego, stymulując komórkę do podziału.

W czasie ciąży stężenie 17 β -estradiolu w organizmie kobiety wzrasta około 100-krotnie w porównaniu do poziomu w okresie owulacyjnym (Baik, 2005; Milczarek, 2007), zapewniając prawidłowy rozwój płodu, podtrzymanie ciąży oraz terminowy poród. Poziom płciowych hormonów steroidowych zależy w dużej mierze od czynników genetycznych, w czym znaczną rolę odgrywają posiadane polimorficzne allele genów kodujących enzymy syntezy (rodzina cytochromów P450) i katabolizmu estrogenów (CYP, COMT). Częstość występowania alleli genów kodujących niektóre z tych enzymów w rejonie Azji Wschodniej, a wpływających na aktywność enzymów jest różna od tej w Europie. Może to wpływać na stężenie E2. I tak na przykład u Azjatek poziom 17 β -estradiolu jest istotnie niższy niż mierzony w analogicznej grupie kobiet rasy Kaukaskiej (Arslan, 2006).

Progesteron, obok E2, jest najważniejszym hormonem steroidowym zaangażowanym w zdolności rozrodcze kobiety. Stanowi on również substrat do syntezy hormonów kory nadnerczy i testosteronu. Progesteron odpowiada za właściwe przygotowanie błony śluzowej macicy na przyjęcie zapłodnionego jaja oraz za utrzymanie ciąży. Stężenie progesteronu w surowicy służy w diagnostyce klinicznej do określenia zagrożenia utrzymania ciąży, jednak w praktyce nie można podać wartości stężeń progesteronu, na podstawie których

można rokować co do przebiegu ciąży. Zdarza się, że nawet przy bardzo niskich stężeniach progesteronu ciąża rozwija się zupełnie prawidłowo (Brosens, Gellersen, 2006).

Dehydroepiandrosteron (DHEA) stanowi substrat do syntezy estrogenów. Oprócz różnicującego i antyapoptotycznego działania przekazywanego poprzez receptory androgenowe (AR), wykazuje własności przeciwutleniające. DHEA i DHEA-S może zapobiegać oksydacyjnym uszkodzeniom biomolekuł, jak również przywracać równowagę oksydacyjną komórek (Tunez, 2005). Kora nadnerczy i wątroba płodu oraz ciężarnej kobiety, syntetyzują duże ilości DHEA i jego sulfopochodnej DHEA-S, które następnie w łożysku służą jako substrat do syntezy 17β -estradiolu. DHEA jest steroidem występującym w największych ilościach w ludzkim organizmie (Khalil, 2000). Regulacja syntezy DHEA odbywa się na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego ze stężeniem estrogenów. Poziom DHEA-S jest również regulowany przez TGF- β za pośrednictwem ER β .

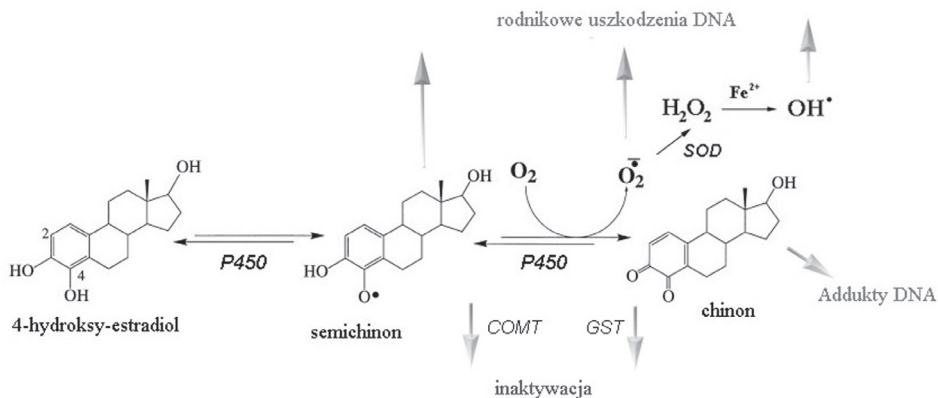
Uszkodzenia oksydacyjne DNA a hormony płciowe

Uszkodzenia w materiale genetycznym pojawiają się podczas całego okresu życia komórki. Ich poziom zależy od zachowania równowagi pomiędzy intensywnością ekspozycji na czynniki uszkadzające, tak endo- jak i egzogenne, a sprawnością systemów ochronnych i naprawczych. Ponadto komórki posiadają wiele możliwości naprawy uszkodzeń DNA.

Akumulacja uszkodzeń w DNA może prowadzić do utraty stabilności genetycznej i zwiększenia ryzyka rozwoju nowotworów. W trakcie replikacji do DNA wbudowywane są błędne zasady z częstotliwością około 1 na 10^6 nukleotydów. Wśród licznych oksydacyjnych uszkodzeń obecnych w cząsteczce DNA do najczęściej występujących należą: 8-oksoguanina (8-okso-G), 8-okso-7,8-dihydro-2'-deoksyguanozyna (8-okso-dG) oraz 2,4-diamino-5- formamidopirymidyna (Fapy- G). Uszkodzenia te znajdują się w centrum zainteresowań naukowców, gdyż charakteryzuje je wysoki mutageny potencjał. Podniesiony poziom tych uszkodzeń obserwowano w tkankach różnych nowotworów, co sugeruje, że akumulacja oksydacyjnie uszkodzonych zasad azotowych DNA może odzwierciedlać wzrost ryzyka nowotworowego, ale także może być biomarkerem mającym znaczenie predykcyjne (Milczarek, 2007; Pasqualini, 2005).

Uszkodzenia oksydacyjne DNA powstają także wskutek autooksydacji katecholo- wych estrogenów powstających podczas katabolizmu estrogenów. Początkowo dochodzi do przekształcenia ich w formy lepiej rozpuszczalne w wodzie, po czym następuje inaktywacja i usunięcie ich z moczem. Enzymy I fazy detoksyfikacji (hydroksylazy z grupy cytochromu P450) katalizują powstanie hydroksylowych pochodnych estrogenów (poprzez hydroksylację w obrębie pierścienia A lub D), które następnie są koniugowane z grupami metylowymi, sulfurowymi lub glutationem przez enzymy II fazy

(Yager, 2000). Katecholowe pochodne estrogenów mogą następnie ulegać utlenieniu przez cytochromy P450 do formy semichinonowej i dalej do chinonowej. Przy udziale NADPH-zależnej reduktazy cytochromu P450, mogą ulec redukcji z powrotem do postaci hydrochinonu. Oba procesy zachodzą poprzez wolnorodnikowe produkty pośrednie. Ponadto, chinonowe formy hydroksyestrogenów mogą reagować bezpośrednio z zasadami azotowymi w DNA tworząc addukty (Ryc. 2).



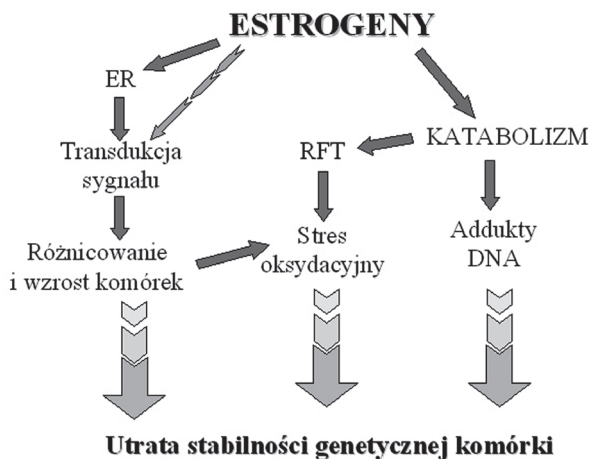
Ryc. 2. Genotoksyczne działanie metabolitów estradiolu

W trakcie cyklicznych reakcji utleniania i redukcji katecholowych pochodnych estrogenów i przechodzenia pomiędzy formami chinon – hydrochinon z udziałem tlenu cząsteczkowego generowane są duże ilości anionorodnika ponadtlenkowego. Anionorodnik ponadtlenkowy może być redukowany enzymatycznie lub nieenzymatycznie do nadtlenu wodoru i dalej do innych RFT. Może to prowadzić do nasilenia się stanu stresu oksydacyjnego w komórce.

Uszkodzenia DNA mogą zostać utrwalone w postaci mutacji w wyniku stymulującego proliferację działania estradiolu i w ten sposób zwiększać ryzyko kancerogenezy. Zaburzenie homeostazy powoduje także, że RFT bezpośrednio uszkadzają DNA. W wyniku oddziaływania reaktywnych form tlenu z zasadami azotowymi DNA powstają glikole tyminy i cytozyny, puryny o otwartych pierścieniach. Reaktywne formy tlenu powstają również w wyniku reakcji nieenzymatycznych pomiędzy estrogenami katecholowymi, czyli produktami hydroksylacji 17 β -estradiolu a jonami metali (Oliński, 2007). Produkty pośrednie tych przemian mogą modyfikować zasady azotowe, wprowadzać pojedyncze pęknięcia do nici i inne oksydacyjne uszkodzenia DNA (Mitrinen, Hirvonen, 2003). Endogenne metabolizmy estrogenów – a w szczególności szybkość usuwania estrogenów katecholowych – ma zatem bezpośredni wpływ na poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA (Baik, 2005).

Po uwzględnieniu efektywnych procesów naprawczych ilość ta jest redukowana do 1 nukleotydu na 10¹⁰.

Utrwalenie takiej zmiany w cyklu replikacyjnym skutkuje powstaniem mutacji punktowej. Wraz z kolejnymi podziałami komórkowymi, mutacje mogą ulegać akumulacji, a usytuowanie ich w genach supresorowych i protoonkogenach może doprowadzić do utraty kontroli nad podziałami komórkowymi oraz transformacji nowotworowej. Estrogeny w kompleksie z receptorami estrogenowymi (ER) stanowią silne stymulatory transkrypcji genów, w tym również tych zaangażowanych w proliferację komórek. Ponadto stwierdzono, iż niektóre metabolity estrogenu mają zdolność kowalencyjnego wiązania się do receptorów estrogenowych powodując ciągłą stymulację wzrostu komórek (Kristensen, 2003). Wszystko to może prowadzić do niestabilności genetycznej komórek prowadzącej często do transformacji nowotworowej (Ryc. 3).



Ryc. 3. Kancerogenne działanie estrogenów

Podczas ciąży w organizmie matki i dziecka powstają duże ilości reaktywnych form tlenu. RFT biorą udział w dojrzewaniu tkanek macicy, implantacji zarodka i rozwoju naczyń krwionośnych łożyska i macicy. Embriogeneza wiąże się z nasileniem stresu oksydacyjnego. W trakcie tego procesu RFT są zaangażowane w sygnalizację komórkową i kontrolę rozwoju płodu podczas replikacji i różnicowania komórek oraz w czasie formowania się organów (Aurousseau, 2006).

Metabolizm witamin i mikroelementów pomaga w utrzymaniu poziomu RFT na takim poziomie, aby nie zaburzać sygnalizacji, równocześnie jednak zapobiegając ich nadmiernej produkcji, co mogłoby doprowadzić do uszkodzenia tkanek płodu i matki lub uniemożliwić implantację zarodka (Seino, 2002).

Współzależności pomiędzy 17 β -estradiolem a metabolitami w szlaku metabolicznym estrogenów

Analiza zmian w stężeniu 17 β -estradiolu (E2) pokazała, że stężenie żeńskich hormonów płciowych w organizmie ciężarnych kobiet (N=65) wzrasta w czasie kolejnych tygodni ciąży. Stwierdzono także, że przyrost ten miał charakter wykładniczy. Wraz z rosnącym stężeniem 17 β -estradiolu i dorastaniem ciąży zaobserwowano także spadek stężenia DHEA-S w surowicy. Taka zależność związana jest z ujemnym sprzężeniem zwrotnym kontrolującym stężenie DHEA przez stężenie 17 β -estradiolu (Labrie, 2005).

W czasie ciąży istotne jest także utrzymanie wysokiego stężenia progesteronu. Synteza progesteronu zachodzi szlakiem niezależnym od syntezy DHEA, a hormon ten jest potencjalnym substratem do produkcji estrogenów. Analiza korelacji semicząstkowej pokazała, że progesteron ma trzykrotnie większy udział w zmianach stężenia 17 β -estradiolu w porównaniu do DHEA-S. Można jednak sądzić, że to wzrastające stężenie 17 β -estradiolu w okresie ciąży kontroluje zarówno stężenie progesteronu jak i DHEA w krążeniu matki (Pepe 1998).

Podczas ciąży obserwuje się także zmiany w metabolizmie lipidów. Stale rosnące stężenie cholesterolu jest niezbędne do nasilającej się syntezy hormonów płciowych. Uzyskane w niniejszym badaniu wyniki pokazały, że stężenie całkowitego cholesterolu w surowicy silnie korelowało ze stężeniami 17 β -estradiolu i progesteronu we krwi.

Siła zależności liniowych pomiędzy 17 β -estradiolem a cholesterolem, progesteronem i DHEA, oceniana wielkością współczynników korelacji Pearsona pokazała, że wraz ze wzrostem stężenia cholesterolu rośnie stężenie progesteronu oraz 17 β -estradiolu, przy czym siła tego związku była większa dla 17 β -estradiolu ($r=0,687$); natomiast wraz ze wzrostem stężenia cholesterolu malało stężenie DHEA-S i związek ten był raczej niewielki ($r=-0,179$). Wraz ze wzrostem stężenia progesteronu malało także stężenie DHEA-S ($r=-0,256$). Najmniejsza siła związku występowała pomiędzy DHEA-S a 17 β -estradiolem ($r=0,011$).

Aby zmierzyć wkład, jaki poszczególne metabolity pośrednie (zmienne) wnoszą w zmiany stężenia 17 β -estradiolu, określono współczynniki korelacji cząstkowej i semicząstkowej. Największy współczynnik korelacji cząstkowej miał cholesterol ($r=0,568$). Wartość ta określa wielkość zależności liniowej po usunięciu jego korelacji ze wszystkimi pozostałymi zmiennymi. Stężenie cholesterolu wyjaśniało samodzielnie prawie 19,2 % ($0,438^2 \times 100$ %) wariancji stężenia 17 β -estradiolu, po wyłączeniu wpływu pozostałych badanych związków. Zaś progesteron miał większy wpływ (wyjaśnia 10,6% zmienności) na stężenie 17 β -estradiolu niż DHEA-S, który wyjaśniał jedynie 3,9 % zmienności stężenia 17 β -estradiolu w czasie ciąży.

Natężenie wzajemnego oddziaływania wszystkich zmiennych niezależnych (cholesterolu, progesteronu i DHEA-S) na stężenie 17 β -estradiolu wyrażony współczynnikiem korelacji

wielorakiej R wynosił 0,77. Największą siłę związku ze stężeniem 17 β -estradiolu wykazywało stężenie cholesterolu, dla którego wartość standaryzowanego współczynnika B wynosiła 2,57 w porównaniu ze stężeniem DHEA-S (0,41) i progesteronu (0,55). Wartość poprawionego $R^2 = 0,59$, zastosowane ze względu na występowanie korelacji między zmiennymi wskazała, że 59 % zmienności 17 β -estradiolu była wyjaśniona przez zastosowany model.

Udział cholesterolu, 17 β -estradiolu, progesteronu, oraz DHEA w poziomie uszkodzeń DNA w limfocytach ciężarnych kobiet – analiza ścieżek

Zarówno pozytywna jak i destrukcyjna rola RFT powstających podczas metabolizmu estrogenów jest mało do tej pory zbadana, a zatem pytanie o udział metabolitów pośrednich w powstawaniu uszkodzeń DNA podczas ciąży wydaje się zasadne.

Badania nad stabilnością genetyczną komórek kobiet w różnym okresie ciąży przeprowadzano w limfocytach. Materiał ten wybrano, ponieważ odzwierciedla on historię ekspozycji organizmu na działanie czynników znajdujących się w krążeniu. W szczególności obecność odpowiednich receptorów w limfocytach pozwala sądzić, że są one dobrym materiałem do badań zmian w uszkodzeniach DNA w relacji z hormonami. Wybór limfocytów wynikał także z faktu, że wykazują one ekspresję genów odpowiedzialnych za syntezę 17 β -estradiolu, a także są w stanie syntetyzować progesteron, DHEA i androstenodion (Zhou, 2002). Czas życia tych komórek i ekspozycja na czynniki krążące wraz z krwią sprawiają, że ich DNA stanowi doskonały biomarker poziomu uszkodzeń materiału genetycznego odzwierciedlający warunki środowiska zewnętrznego jak i wewnętrznego organizmu dawcy.

Uszkodzenia DNA badano metoda kometową: uszkodzenia alkali-labilne (K), uszkodzenia związane z utlenieniem zasad pirymidynowych (E) i zasad purynowych (F), a także uszkodzenia netto, czyli różnica pomiędzy poziomem uszkodzeń DNA uzyskanym po inkubacji z enzymem rozpoznającym utlenione zasady (endonukleaza III – zasady pirymidynowe; Fpg – zasady purynowe) i bez enzymu, czyli uszkodzeń alkali-labilnych (E-K i odpowiednio F-K). Chcąc uzyskać interpretację przyczynową związku pomiędzy stężeniami E2 (EST), progesteronu (PROG), cholesterolu (CHOL), DHEA a poziomem uszkodzeń DNA w limfocytach zastosowano analizę statystyczną zwaną analizą ścieżek (path analysis). Ta unikatowa metoda zakłada, że wariancja zmiennej endogenicznej (poziom uszkodzeń DNA, K, E-K, F-K) jest w całości wyjaśniana przez zmienne endogeniczne (EST, PROG, CHOL, DHEA), które – w przeciwieństwie do analizy regresji – mogą być ze sobą skorelowane przez nieskorelowany z nimi składnik losowy. Budowany jest diagram zależności przyczynowo-skutkowych obrazujący oddziaływania zmiennych egzogenicznych na zmienną endogeniczną i uwzględniający następstwa czasowe (przyczyna poprzedza skutek).

Wyliczane w modelu współczynniki ścieżkowe umożliwiają dekompozycję korelacji, gdyż odpowiadają one wielkościom wpływów bezpośrednich. Zatem całkowita korelacja zmiennej endogenicznej i zmiennej egzogenicznej może być rozbita na wpływy bezpośrednie (równe korelacjom cząstkowym) i pośrednie, tzn. na oddziaływania zmiennej egzogenicznej przez pozostałe zmienne na wszystkich ścieżkach diagramu (Wright 1960).

W pracy posłużono się współczynnikami korelacji Pearsona, a współczynniki ścieżkowe obliczono ze wzoru: $[p_i] = R^{-1} \cdot r_{iy}$, gdzie R – jest macierzą korelacji zmiennych egzogenicznych, a r_{iy} – oznacza wektor korelacji zmiennych egzogenicznych ze zmienną endogeniczną. Bazując na powyższym równaniu możemy posłużyć się także innymi miarami współzależności cech ze znakiem (np. opartymi na statystyce Chi-kwadrat w sytuacji, gdy zmienne są wyrażone w słabych skalach, ale porządkowych) (Chrzanowska, Matusik, 2006).

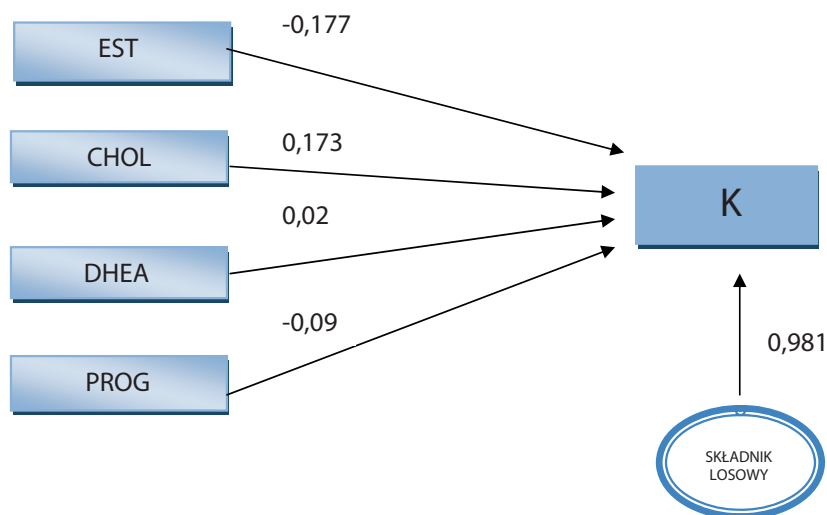
Analizując hierarchię wpływów, czyli udziały poszczególnych zmiennych egzogenicznych w wyjaśnianiu wariancji zmiennej endogenicznej, jako 100% przyjęto wyjaśnianą przez model wielkość wariancji, czyli wartość współczynnika determinacji R^2 .

Współczynniki korelacji cząstkowych, reprezentowane na diagramie jako współczynniki ścieżkowe, umożliwiają wyznaczenie oddziaływań bezpośrednich. Wpływy pośrednie na zmienną zależną wyznaczone są przez różnicę między współczynnikiem korelacji Pearsona, reprezentującym całkowite oddziaływanie wzajemne, a wartością współczynnika cząstkowego. Wpływy pośrednie dokonują się poprzez wzajemnie skorelowane zmienne niezależne. Można zatem wyznaczyć w procentach zarówno udziały oddziaływań bezpośrednich, jak i pośrednich.

Należy zauważyć, że z powodu występowania powiązań między zmiennymi egzogenicznymi, wyjaśnianie całkowitej wariancji zmiennej zależnej w analizowanych modelach jest na ogół niewielkie, co objawia się relatywnie niską wartością współczynnika determinacji R^2 . Jednak zastosowanie np. metod regresyjnych prowadziłoby do uzyskania wyników niepoprawnych, z powodu niespełnienia założenia o niezależności zmiennych egzogenicznych lub uzyskania w wielu przypadkach modeli zawierających tylko wartość stałą, pomijających zmienne egzogeniczne.

Dla każdej ze zmiennych zależnych, czyli alkali-labilnych uszkodzeń DNA (K); sumy uszkodzeń alkali-labilnych i utlenionych zasad pirymidynowych (E) i pirymidynowych (F) oraz oksydacyjnych uszkodzeń netto: zasad pirymidynowych (E-K) i zasad purynowych (F-K), zbudowano diagram obrazujący model oddziaływań zmiennych niezależnych, którymi były 4 zmienne: stężenie 17β -estradiolu (EST) [pg/ml], cholesterolu (CHOL) [mM], DHEA [μ g/dl] i progesteronu (PROG) [ng/ml].

Poniżej przedstawiono model dla zmiennej K (Ryc. 4) wraz z oszacowanymi współczynnikami ścieżkowymi (wartości umieszczone nad strzałkami).

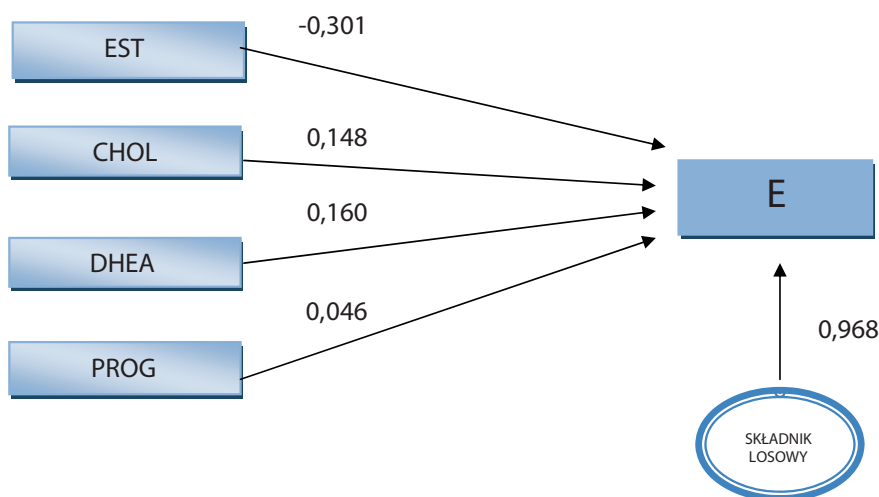


Ryc. 4. Model ścieżkowy oddziaływań 17 β -estradiolu (EST), cholesterolu (CHOL), DHEA i progesteronu (PROG) na poziom endogennych alkali-labilnych pęknięć w pojedynczych niciach DNA (K) w limfocytach ciężarnych kobiet.

Model ten wyjaśniał 3,8% zmienności ($1-r^2$, gdzie $r=0,981$). Największy udział w tej zmienności miał 17 β -estradiał (EST) 60,3%, następnie progesteron (PROG) 26,3% oraz cholesterol (CHOL) 13,3%, natomiast wpływ DHEA był minimalny 0,15% i zmienną tą można usunąć z modelu.

Oddziaływanie 17 β -estradiolu i cholesterolu odbywało się bardziej w sposób bezpośredni (odpowiednio 54,3% i 54,6%), natomiast progesteron działał w tym modelu w 68,6% w sposób pośredni, głównie przez cholesterol i 17 β -estradiał. Podobnie DHEA działało na K (poziom uszkodzeń alkali-labilnych) w 72,8% pośrednio, również poprzez 17 β -estradiał i cholesterol.

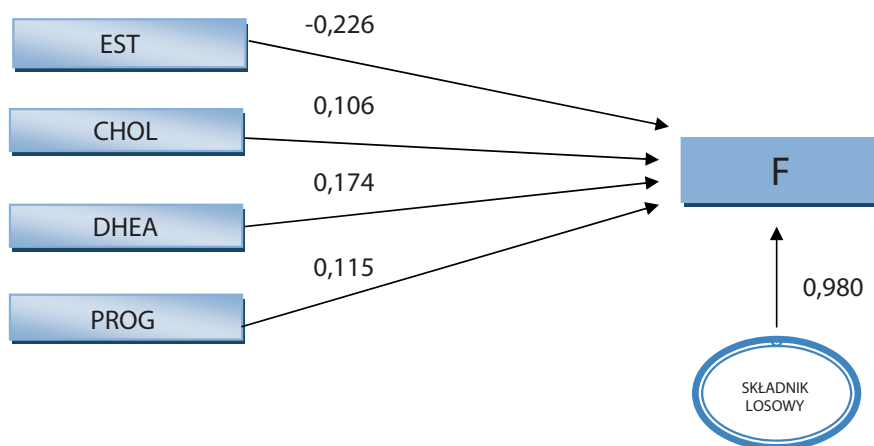
Kolejny model opisuje strukturę wpływów na zmienną E (Ryc. 5).



Ryc. 5. Model ścieżkowy oddziaływań 17β -estradiolu (EST), cholesterolu (CHOL), DHEA i progesteronu (PROG) na poziom sumy endogennych alkali-labilnych i oksydacyjnych uszkodzeń zasad pirymidynowych w pojedynczych niciach DNA (E) w limfocytach ciężarnych kobiet.

Wyjaśniany poziom wariancji zmiennej E wynosi 6,4%, w czym estradiol miał udział ponad 2/3 (67,6%), zaś DHEA – ponad 1/5 (21,5%). Udział cholesterolu i progesteronu kształtował się na poziomie około 5% (odpowiednio 5,4% i 5,5%). DHEA wpływało na E w 76% w sposób bezpośredni, a estradiol w 72%. Oddziaływanie cholesterolu w 58,9% odbywało się w sposób pośredni (głównie przez estrogen), natomiast progesteron działał na E w 86% pośrednio, w większości przez 17β -estradiolu.

Na rycinie 6. przedstawiono model oddziaływania analizowanych zmiennych na F. Wyjaśniany poziom wariancji zmiennej F wynosi 4%, przy niemal identycznym udziale zmiennych DHEA (48,9%) i 17β -estradiolu (48,7%). Można w tym modelu pominąć wpływ cholesterolu (0,2%), natomiast progesteron, wyjaśniający 2,2% zmienności F działał głównie pośrednio przez estradiol, a w mniejszej części przez cholesterol i DHEA. Ten ostatni związek oddziaływał na F bezpośrednio w 75,8%, a 17β -estradiolem w 62,3%.



Ryc. 6. Model ścieżkowy oddziaływań 17β -estradiolu (EST), cholesterolu (CHOL), DHEA i progesteronu (PROG) na sumę endogennych uszkodzeń alkali-labilnych i oksydacyjnych uszkodzeń zasad purynowych (F).

Podsumowanie

We wszystkich analizowanych zależnościach obserwowano negatywną zależność pomiędzy 17β -estradiolem a uszkodzeniami DNA, co wskazuje na ochronne działanie tego hormonu. Jest to o tyle interesujące, że dane epidemiologiczne wskazują, że wczesna ciąża (poniżej 20 roku życia) obniża ryzyko zachorowania na nowotwory piersi (Baeyens, 2005). Sądzi się, że wczesne zróżnicowanie komórek nabłonkowych kanalików mlecznych, czyni je mniej wrażliwymi na późniejszą ekspozycję na czynniki sprzyjające transformacji nowotworowej (Mitrinen, Hirvonen, 2003). Na modelach zwierzęcych, pokazano, że krótkotrwała ekspozycja na fizjologiczne dawki progesteronu i 17β -estradiolu podnosi stabilność genetyczną komórek gruczołu sutkowego, natomiast hormony te podawane oddzielnie, nie wywołują efektu ochronnego (Tu, 2005). Niedobór estrogenów spowodowany usunięciem jajników wiąże się z indukcją stresu oksydacyjnego w wielu tkankach zwierząt laboratoryjnych. Stwierdzono, iż podanie 17β -estradiolu i/lub katecholowych estrogenów (2- i 4-hydroksyestradiol) przeciwdziała skutkom stresu tlenowego w erytrocytach i osoczu po resekcji jajników, również po podaniu toksyn indukujących stres oksydacyjny (Munoz-Castaneda, 2006). Wykazano ochronne działanie 17β -estradiolu przeciw skutkom stresu tlenowego na stabilność genetyczną komórek siatkówki poprzez oddziaływanie na drodze pozagenomowej (Bucolo, Drago, 2007). Ponadto stwierdzono, iż 17β -estradiol

administrowany *in vitro* chroni neurony myszy przed uszkodzającym wpływem H_2O_2 (Cao, 2003). 17β -estradiolu chroni LDL przed utlenieniem i cytotoksycznym wpływem utlenionych LDL na komórki łożyska w odróżnieniu od progesteronu, który, jak stwierdzono, promuje te efekty (Zhu, 1997).

W czasie ciąży to prawdopodobnie estrogeny, jako jedyne steroidy, pełnią funkcję przeciwutleniającą (Reyes, 2006), jednak doniesienia z zastosowaniem bardzo wysokich stężeń 17β -estradiolu ($10 \mu M$) *in vitro* wymagały weryfikacji w badaniach *in vivo*. Wszystkie te obserwacje wskazują, że metabolizm hormonów płciowych ogrywa istotną rolę w poziomie stresu oksydacyjnego w organizmie. Zwłaszcza jest to istotne w okresie ciąży. Status estrogenowy w czasie ciąży wpływa zarówno na organizm płodu jak i organizm matki. Podczas metabolizmu 17β -estradiolu są bowiem generowane wolne rodniki i reaktywne formy tlenu zdolne do uszkodzania struktur komórkowych oraz materiału genetycznego czyniąc z 17β -estradiolu czynnik potencjalnie kancerogeny. Potwierdzają to eksperymenty prowadzone *in vitro* a także badania epidemiologiczne (Kobiela, 2007; Yager, 2000). Największą rolę w kancerogenezie odgrywają zdolności 17β -estradiolu do stymulacji proliferacji komórek, ponieważ podczas podziałów dochodzi do utrwalania uszkodzeń w postaci mutacji wywołanych działaniem katecholo- wych pochodnych estradiolu (Roy, 2007).

Zaobserwowana ochronna rola estrogenu na DNA limfocytów, wyrażona ujemną korelacją pomiędzy stężeniem 17β -estradiolu, zdaje się wynikać nie tylko z ich własności antyoksydacyjnych, ale także z roli, jaką odgrywa on we wczesnym różnicowaniu komórek gruczołów piersiowych, czy zablokowania proliferacji tych komórek przez indukcję ekspresji p53 (Sivaraman, 2001). Ta zdolność do zmiatania wolnych rodników najlepiej ilustruje zahamowanie procesów peroksydacji lipidów w obecności estrogenów, co wydaje się mieć szczególne znaczenie dla rozwijającego się centralnego układu nerwowego płodu (Reyes, 2006). Jest to o tyle istotne, że w okresie ciąży, stanie fizjologicznym o dużym zapotrzebowaniu metabolicznym, indukowany jest stres oksydacyjny. Równowaga oksydacyjna wydaje się być zapewniona dzięki silnym własnościom przeciwutleniającym estrogenu.

Ochronna rola estrogenu wyjaśniania jest także przez wyniki badań wskazujące, że podniesienie stężenia estrogenów powoduje wzrost antyoksydacyjnej siły osocza (Delibasi, 2006). Te przeciwutleniające własności 17β -estradiolu i progesteronu obecnych w osoczu zostały także potwierdzone przez wielu innych autorów (Widyarini, 2006, Reyes, 2006).

Metoda analizy ścieżkowej umożliwiła nie tylko na określenie siły wpływów zewnętrznych na średni poziom uszkodzeń DNA, ale również na określenie proporcji tych oddziaływań. Proporcje można było określić dzięki posługiwaniu się standaryzowanymi zmiennymi, charakteryzującymi się brakiem jednostek miary (różnych dla rozważanych zmiennych) oraz jednorodnymi wielkościami średnich i wariancji.

Ustalono także hierarchię wpływów metabolitów pośrednich (zmienne niezależne) na kolejno analizowane uszkodzenia DNA (zmienne endogeniczne). Dzięki zastosowaniu tej metody, możliwe też było uzyskanie wiedzy o sposobie tych oddziaływań, dzięki ich rozdzieleniu na oddziaływania bezpośrednie oraz pośrednie. Wyznaczenie współczynników korelacji cząstkowych pozwoliło na określenie oddziaływań bezpośrednich, reprezentowanych przez wielkość współczynników ścieżkowych. Wpływy pośrednie na zmienną zależną, realizowane poprzez skorelowanie z pozostałymi zmiennymi niezależnymi, były różnicą między współczynnikiem korelacji Pearsona a wartością współczynnika cząstkowego. Dzięki temu można było uzyskać informacje o wielkościach procentowych udziałów oddziaływań pośrednich, realizowanych przez daną zmienną egzogeniczną poprzez pozostałe zmienne niezależne. Stały się dodatkowym źródłem danych dla przeprowadzonych analiz statystycznych.

Literatura

1. Arslan, A.A., et al., Effects of parity on pregnancy hormonal profiles across ethnic groups with a diverse incidence of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006. 15(11), 2123–30
2. Aurousseau, B., D. Gruffat, and D. Durand, Gestation linked radical oxygen species fluxes and vitamins and trace mineral deficiencies in the ruminant. *Reprod Nutr Dev*, 2006. 46(6), 601–20.
3. Baeyens, A., et al., Effects of estradiol and progesterone on the variability of the micronucleus assay. *Mutat Res*, 2005. 578(1–2), 308–16.
4. Baik, I., et al., Association of fetal hormone levels with stem cell potential: evidence for early life roots of human cancer. *Cancer Res*, 2005. 65(1), 358–63.
5. Brosens, J.J. and B. Gellersen, Death or survival–progesterone–dependent cell fate decisions in the human endometrial stroma. *J Mol Endocrinol*, 2006. 36(3), 389–98.
6. Bucolo, C. and F. Drago, Neuroactive steroids protect retinal tissue through sigma1 receptors. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2007. 100(3), 214–6.
7. Cao, W., et al., Neuroprotective effect of estrogen upon retinal neurons in vitro. *Adv Exp Med Biol*, 2003. 533, 395–402.
8. Chrzanowska M., Matusik S. (2006), Male Inhabitants of Krakow and their Self-assessment of Health Condition in the Light of some of Selected Biological Traits, Social Variables, and Lifestyles, *Polish Journal of Environmental Studies*, Vol. 15, No 2B, Part IV, 1034–1037.
9. Delibasi, T., et al., Antioxidant effects of hormone replacement therapy in postmenopausal women. *Swiss Med Wkly*, 2006. 136(31–32), 510–4.

10. Khalil, A., et al., Age-related decrease of dehydroepiandrosterone concentrations in low density lipoproteins and its role in the susceptibility of low density lipoproteins to lipid peroxidation. *J Lipid Res*, 2000. 41(10), 1552–61.
11. Kobiela, J., et al., Dynamics of estrogen-induced oxidative stress. *Acta Biochim Pol*, 2007. 54(2), 289–95.
12. Kristensen, V.N., et al., Gene expression profiling of breast cancer in relation to estrogen receptor status and estrogen-metabolizing enzymes, clinical implications. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(2 Pt 2), 878s–83s.
13. Labrie, F., Luu-The, V., Bélanger, A., Lin, S-X., Simard, J., Pelletier, G. and a.C. Labrie, Is dehydroepiandrosterone a hormone? *Journal of Endocrinology*, 2005. 187, 169–196.
14. Milczarek, R., et al., The NADPH- and iron-dependent lipid peroxidation in human placental microsomes. *Mol Cell Biochem*, 2007. 295(1–2), 105–11.
15. Mitrunen, K. and A. Hirvonen, Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mutat Res*, 2003. 544(1), 9–41.
16. Munoz-Castaneda, J.R., et al., Estradiol and catecholestrogens protect against adriamycin-induced oxidative stress in erythrocytes of ovariectomized rats. *Toxicol Lett*, 2006. 160(3), 196–203.
17. Olinski, R., et al., Oxidative damage to DNA and antioxidant status in aging and age-related diseases. *Acta Biochim Pol*, 2007. 54(1), 11–26.
18. Pasqualini, J.R., Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005. 97(5), 401–15.
19. Pepe, G.J. and E.D. Albrecht, Central integrative role of oestrogen in the regulation of placental steroidogenic maturation and the development of the fetal pituitary-adrenocortical axis in the baboon. *Hum Reprod Update*, 1998. 4(4), 406–19.
20. Reyes, M.R., A. Sifuentes-Alvarez, and B. Lazalde, Estrogens are potentially the only steroids with an antioxidant role in pregnancy: in vitro evidence. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2006. 85(9), 1090–3.
21. Roy, D., et al., Estrogen-induced generation of reactive oxygen and nitrogen species, gene damage, and estrogen-dependent cancers. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2007. 10(4), 235–57.
22. Seino, T., et al., Eight-hydroxy-2'-deoxyguanosine in granulosa cells is correlated with the quality of oocytes and embryos in an in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril*, 2002. 77(6), 1184–90.
23. Sivaraman, L., et al., p53 is a potential mediator of pregnancy and hormone-induced resistance to mammary carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(22), 12379–84.
24. Szeto, Y.T., W.K. Chu, and I.F. Benzie, Antioxidants in fruits and vegetables: a study of cellular availability and direct effects on human DNA. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006. 70(10), 2551–5.

25. Troisi, R., et al., Correlation of serum hormone concentrations in maternal and umbilical cord samples. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003. 12(5), 452–6.
26. Tu, Y., et al., Sensitivity to DNA damage is a common component of hormone-based strategies for protection of the mammary gland. *Mol Cancer Res*, 2005. 3(8), 435–42.
27. Tunez, I., M.C. Munoz, and Montilla, Treatment with dehydroepiandrosterone prevents oxidative stress induced by 3-nitropropionic acid in synaptosomes. *Pharmacology*, 2005. 74(3), 113–8.
28. Widyarini, S., et al., Estrogen receptor signaling protects against immune suppression by UV radiation exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(34), 12837–42.
29. Wright S., 1960, Path Coefficients and Path Regressions: Alternative or Complementary Concepts?, *Biometrics* 16, June 1960, 189–202.
30. Yager, J.D., Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2000(27), 67–73.
31. Zhou, Q., et al., Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J Androl*, 2002. 23(6), 870–81.
32. Zhu, X.D., B. Bonet, and R.H. Knopp, 17beta-Estradiol, progesterone, and testosterone inversely modulate low-density lipoprotein oxidation and cytotoxicity in cultured placental trophoblast and macrophages. *Am J Obstet Gynecol*, 1997. 177(1), 196–209.